

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 玉 野 孝 一

本研究では、赤痢菌の腸管上皮細胞への侵入に必要な病原因子の輸送を行うⅢ型分泌装置の構造及び機能について電子顕微鏡観察を中心として解析を行った。その結果、下記の1～6の結果を得ている。

1. 赤痢菌のⅢ型分泌装置の超分子構造を電子顕微鏡観察により明らかにすることを試みた。最初に、赤痢菌野生株を浸透圧ショック処理し、その後菌体膜を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、野生株の菌体表面には菌体膜から菌体外部へと突出する針状の構造体が、一菌体あたり50-100個観察された。このような構造は、Ⅲ型分泌装置を作製する遺伝子を欠失した非病原性株では観察されなかった。このことより、この構造体は赤痢菌Ⅲ型分泌装置であるものと考えられた。そこで、このⅢ型分泌装置を精製し、透過型電子顕微鏡にて観察を行った。その結果、赤痢菌のⅢ型分泌装置は、針部分と基部部分からなる円柱対称の針状の構造をしていることが、明らかとなった。更に、基部部分は上下に各々二重のリングを有していることが認められた。そして、Ⅲ型分泌装置の各部分の大きさを測定したところ、針部分は長さ45.4 nm・太さ8.4 nm、基部部分は長さ31.6 nmであることが認められた。

2. サルモネラⅢ型分泌装置の構成成分である三種類の蛋白の赤痢菌ホモログMxiD, MxiG, MxiJは、イムノプロット及びアミノ末端配列決定解析の結果、赤痢菌Ⅲ型分泌装置の構成成分であることが認められ、いずれも膜蛋白であるために、基部部分を構成しているものと考えられた。そこで、針部分の構成成分を明らかにすることを試みた。項目3で述べるように*spa47*変異株では針部分を欠失した基部部分のみのⅢ型分泌装置が作製された。そこで、当変異株のⅢ型分泌装置と野生株の同分泌装置の部分精製サンプルのSDS-PAGEのバンドパターンを比較したところ、9 kDa付近に野生株には存在し*spa47*変異株には存在しないバンドが確認された。一方、MxiD, MxiG, MxiJに相当するバンドは、両菌株に共通して同量に認められたため、MxiD, MxiG, MxiJは基部部分を構成する成分であることが示唆された。この9 kDaのバンドをアミノ末端配列決定解析に供したところ、*mxi*オペロンの遺伝子産物であるMxiHのアミノ末端に一致する配列を読むことができた。そし

て、*mxiH*変異株を作製してそのⅢ型分泌装置の構造を解析した結果、針部分を欠失した当分泌装置が観察されたことから、赤痢菌Ⅲ型分泌装置の針部分は主にMxiHにより構成されているものと示唆された。

3. サルモネラべん毛では、基部部分から菌体外へとフックが伸び、さらにそこからべん毛繊維がのびている。我々は、Ⅲ型分泌装置とサルモネラべん毛との構造上の類似性から、Ⅲ型分泌装置の針部分は、べん毛のフックに相当するものと推測した。べん毛フックは、その構成成分であるFlgEが、細胞質のF1型ATPase FliIの作用によりべん毛基部を介して菌体外へと輸送され、そこで複合体となって形成される。赤痢菌には、このFliIに非常に高いアミノ酸配列の相同性のあるSpa47が存在する。そこで、このSpa47が、針部分の構成成分の輸送を担っているものと想定し、*spa47*変異株を作製して、そのⅢ型分泌装置の構造を観察した。その結果、*spa47*変異株は針部分を欠失した基部部分のみのⅢ型分泌装置を作製することが認められた。このことから、Spa47はⅢ型分泌装置の針部分の形成に必要であり、針部分の構成成分MxiHを基部から菌体外に輸送するのに必要であることが認められた。

4. 針部分を欠失したⅢ型分泌装置を作製する*mxiH*変異株及び*spa47*変異株を、それぞれ赤痢菌にIpa蛋白などのエフェクターの分泌を誘導するコンゴレッド添加PBS液に懸濁して、IpaB, IpaC, IpaDの分泌をウエスタンブロットにより調べた。その結果、両変異株ではこれらのエフェクターの分泌が行われなかった。更に、IpaB, IpaC, IpaD以外のエフェクターの分泌をSDS-PAGE後のゲルの銀染色により調べたところ、両変異株はIpa以外のエフェクターの分泌も行っていないことが認められた。このことから、MxiHによる針部分の形成は赤痢菌のエフェクター分泌に必須であることが認められた。

5. 赤痢菌野生株の*mxiH*遺伝子を蛋白大量発現用プラスミドpTB101にクローニングし、これを*mxiH*変異株に導入した。そして、当菌株のⅢ型分泌複合体を精製し、その構造を透過型電子顕微鏡観察により解析した。その結果、非常に長い針部分を有するⅢ型分泌装置を観察することができた。これらの497個のⅢ型分泌複合体の針部分の長さを測定し、その分布を調べたところ、針部分の長さは45 nmから1 μ mまで広い領域に分布していた。このようなさまざまな長さの針部分は、実際に菌体表面から菌体外へと突出していることが観察された。以上のことより、赤痢菌の針部分の長さは、その構成成分であるMxiHの菌体内での生産量に影響を受けることが認められた。次に、このMxiHを大量発現した

*mxiH*変異株のHeLa細胞への侵入性を調べた結果、当菌株は野生株に比べ二倍以上の細胞侵入性を示した。このことは、当菌株はMxiHを大量発現して針部分が非常に長くなったため、HeLa細胞により接触しやすくなり、その結果野生株に比べより効率的に細胞侵入することができたものと考えられた。

6. III型分泌装置の針部分は、野生株では45 nmに長さが一定に制御されている。しかし、赤痢菌のIII型分泌装置の作製に必要なおよそ20もの遺伝子のうち*spa32*遺伝子を欠損した赤痢菌では、針部分の長さが厳密に制御されず、45 nmから1150 nmまでのさまざまな長さの針部分を有するIII型分泌装置が作製されることが認められた。この*spa32*変異株に、野生型の*spa32*遺伝子を導入すると、菌体は野生株と同じ45 nmの均一な長さの針部分を作製した。一方、*spa32*変異株に針部分の主要構成成分であるMxiHを大量発現させると、菌体は5 μ mを越える異常な長さの針部分を有するIII型分泌装置を作製した。このことから、Spa32は、赤痢菌III型分泌装置の針部分の長さ制御に関わっていることが認められた。

以上の結果より、赤痢菌のIII型分泌装置は、針部分と基部部分からなる針状の構造をしており、針部分はMxiH、基部部分はMxiD, MxiG, MxiJにより主に構成され、更に針部分の長さはMxiH及びSpa32の存在量に影響され、また針部分はエフェクターの分泌に必須であることが明らかとなった。